

538, 481

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 6 月 24 日 (24.06.2004)

PCT

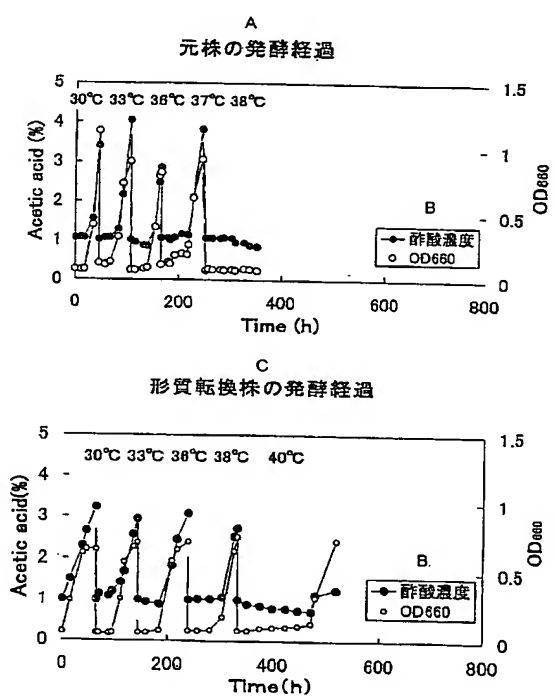
(10) 国際公開番号
WO 2004/053122 A1

- | | | |
|---|---|--|
| (51) 国際特許分類 ⁷ : C07K 14/195, C12N 1/21, C12J 1/04 | C12N 15/09, | CORPORATION) [JP/JP]; 〒475-8585 愛知県 半田市 中村町 2 丁目 6 番地 Aichi (JP). |
| (21) 国際出願番号: | PCT/JP2003/015542 | (72) 発明者; および |
| (22) 国際出願日: | 2003 年 12 月 4 日 (04.12.2003) | (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 後藤 英嗣 (GOTO, Hidetsugu) [JP/JP]; 〒080-0854 北海道 帯広市 南町東四条 1-9 Hokkaido (JP). |
| (25) 国際出願の言語: | 日本語 | (74) 代理人: 戸田 親男 (TODA, Chikao); 〒105-0001 東京 都 港区 虎ノ門 1-1 9-1 4 邦楽ビル 503 戸田特 許事務所 Tokyo (JP). |
| (26) 国際公開の言語: | 日本語 | |
| (30) 優先権データ: 特願2002-356844 2002 年 12 月 9 日 (09.12.2002) JP | | |
| (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式 会社ミツカングループ本社 (MITSUKAN GROUP | (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, | |

[続葉有]

(54) Title: GENE IMPROVING TEMPERATURE-TOLERANCE OF ACETIC ACID BACTERIUM, ACETIC ACID BACTERIUM BRED USING THE GENE AND PROCESS FOR PRODUCING VINEGAR USING THE ACETIC ACID BACTERIUM

(54) 発明の名称: 酢酸菌の温度耐性向上遺伝子、該遺伝子を用いて育種された酢酸菌、及び該酢酸菌を用いた食酢の製造方法



A...FERMENTATION PROCESS OF ORIGINAL STRAIN
B...ACETIC ACID CONCENTRATION
C...FERMENTATION PROCESS OF TRANSFORMANT

(57) Abstract: It is intended to provide a novel gene originating in an acetic acid bacterium which participates in temperature-tolerance; a method of improving the temperature-tolerance of a microorganism, in particular, an acetic acid bacterium using the above gene; and a process for efficiently producing vinegar having an elevated acetic acid concentration using an acetic acid bacterium having an improved temperature-tolerance. From a chromosomal DNA library of acetic acid bacteria, a novel gene participating in temperature-tolerance is cloned from a practically usable acetic acid bacterium belonging to the genus *Gluconoacetobacter* by using a method of obtaining a gene which has a function of enabling growth even under such temperature conditions as allowing no growth in usual. A transformant constructed by transferring the above gene into an acetic acid bacterium shows a remarkably improved temperature-tolerance. When this transformant is cultured under aeration and stirring in the presence of ethanol, the final acetic acid concentration can be remarkably elevated.

(57) 要約: 本発明は、酢酸菌由来の温度耐性に関与する新規な遺伝子、該遺伝子を用いて微生物、特に酢酸菌の温度耐性を向上させる方法、及び温度耐性が向上した酢酸菌を用いて、より高酢酸濃度の食酢を効率良く製造する方法を提供する。本発明において、酢酸菌の染色体DNAライブラリーから、通常は増殖できない温度条件下でも生育を可能にさせる機能を有する遺伝子を取得する方法によって、グルコンアセトバクター属に属する実用酢酸菌から、温度耐性に関与する新規な遺伝子をクローニングした。また、該遺伝子を酢酸菌に導入してなる形質転換株

においては、顕著に温度耐性が

[続葉有]

WO 2004/053122 A1



DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ユーロパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

酢酸菌の温度耐性向上遺伝子、該遺伝子を用いて育種された酢酸菌、
及び該酢酸菌を用いた食酢の製造方法

発明の属する技術分野

本発明は、微生物に由来する温度耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードする遺伝子、これのコピー数を増幅した微生物、特にアセトバクター属（*Acetobacter*）及びグルコンアセトバクター属（*Gluconacetobacter*）に属する酢酸菌、及びこれらの微生物を用いて高濃度の酢酸を含有する食酢を効率よく製造する方法に関する。

従来の技術

工業的な食酢製造においては、微生物による酢酸発酵が利用されている。このような微生物はアルコール酸化能を有し、一般に酢酸菌と呼ばれる。酢酸菌の中でも特に、アセトバクター属及びグルコンアセトバクター属に属する酢酸菌は、工業的な酢酸発酵に広く利用されている。

酢酸発酵では、培地中のエタノールが酢酸菌によって酸化されて酢酸に変換されるが、その結果、そのまま酢酸が培地中に蓄積することになる。その際、多量の発酵熱が発生し、その結果、そのまま放置した場合は、発酵液の温度が上昇することになる。酢酸菌の発酵温度は通常 30℃前後が適温であるので、発酵液の温度を上昇させないよう、発酵液を冷却する必要があるが、その結果、冷却のためのエネルギーがかかることになる。そのため、酢酸発酵においては、より高い温度でも増殖能力や発酵能力が低下しないこと、すなわち温度耐性の強い酢酸菌を開発することが求められており、その一手段として、温度耐性を持った酢酸菌を自然界からスクリーニングすることによって温度耐性酢酸菌を検索する試みがなされていた（例えば、非特許文献 1 参照）。

しかし、酢酸菌の温度耐性遺伝子に関する知見は殆ど無く、酢酸菌の温度耐性

を実用レベルで向上させうる機能を有するタンパク質をコードする新規な温度耐性遺伝子を取得し、また取得した温度耐性遺伝子を用いて、より強い温度耐性を有する酢酸菌を育種することが望まれていた。

特許文献 1

特開昭 60-9488 号公報

特許文献 2

特願 2003-350265 明細書

非特許文献 1

「アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry)」、44 巻、p. 2901-2906、1980 年

非特許文献 2

「トレンズ・イン・ジェネティクス (Trends in Genetics)」、5 巻、p. 185-189、1989 年

非特許文献 3

「アプライド・アンド・エンバイロメンタル・マイクロバイオロジー (Applied and Environmental Microbiology)」、55 巻、p. 171-176、1989 年

非特許文献 4

「アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry)」、52 巻、p. 3125-3129、1988 年

非特許文献 5

「アグリカルチュラル・アンド・バイオロジカル・ケミストリー (Agricultural and Biological Chemistry)」、49 巻、p. 2091-2097、1985 年

非特許文献 6

「バイオサイエンス・バイオテクノロジー・アンド・バイオケミストリー (Bioscience, Biotechnology and Biochemistry)」、58 巻、p. 974-975、1994 年

非特許文献 7

「セルロース (Cellulose)」、p. 153-158、1989年
非特許文献8

「ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (Journal of Bacteriology)」、175
巻、6857-6866、1993年

発明が解決しようとする課題

以上のように、従来より酢酸菌の温度耐性を遺伝子レベルで解明し、高い温度耐性を有する実用酢酸菌の開発に成功した例は報告されていない。しかし、温度耐性にすぐれた酢酸菌が開発されれば、従来よりも高温で酢酸発酵が行なわれ、冷却コストの軽減が可能になることから、本発明者は、再度、酢酸菌の温度耐性の向上を遺伝子レベルで解明することとした。

そして本発明者は、各方面から検討した結果、温度耐性を実用レベルで向上させる機能を有するタンパク質をコードする新規な温度耐性遺伝子を取得し、また取得した温度耐性遺伝子を用いて、より強い温度耐性を有する酢酸菌を育種することが重要であるとの観点にたち、酢酸菌に属する微生物由来の温度耐性に関与する新規な温度耐性向上遺伝子を提供すること、及び該遺伝子を用いて微生物の温度耐性を向上させる方法、特に酢酸菌に属する微生物の温度耐性を向上させる方法、さらに温度耐性が向上した酢酸菌を用いて、食酢を効率よく製造する方法を提供することを新規技術課題として新たに設定した。

課題を解決するための手段

本発明者は、高温下においても増殖し、発酵することができる酢酸菌には、他の微生物には存在しない特異的な温度耐性に関与する遺伝子が存在するとの仮説を立てた。そして、こうした遺伝子を用いれば、従来以上に微生物の温度耐性を向上させることができ、効率的な製造法を開発することが可能になるとの新規着想を得た。

前記従来技術における温度耐性遺伝子の取得方法は、温度非感受性の変異株をスクリーニングする方法が一般的であった。

しかし、本発明者は、この方法では産業上有用な温度耐性遺伝子を見出すこと

は困難であると考え、他の取得方法を検討した。その結果、酢酸菌の染色体DNAライブラリーを構築し、この染色体DNAライブラリーを酢酸菌に形質転換することにより、通常は寒天培地上において37℃程度でしか生育できない株を、38℃の温度下でも生育可能にする遺伝子をスクリーニングすることによって取得する方法を開発した。

この方法によって、実際に食酢製造に用いられているグルコンアセトバクター属の酢酸菌から、温度耐性を実用レベルで増強させる機能を有する新規な温度耐性遺伝子をコードするDNAをクローニングすることにはじめて成功した。

得られた温度耐性遺伝子は、DDBJ/EMBL/Genbankにおいてホモロジー検索をした結果、根粒菌などで見出されているセラミドグルコシルトランスフェラーゼと称される一群のタンパク質と相同性を示しており、酢酸菌のセラミドグルコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子であると推定された。

しかし、取得された酢酸菌のセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子は、根粒菌などの他の微生物で見出されている既知のセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子とは相同性が極めて低かったことから、他のセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子とはある程度似ているものの酢酸菌に特異的な新規タンパク質（タンパク質GCSということもある）をコードする新規遺伝子であることを見出した。

さらに、エタノール存在下で該形質転換株を通気培養した場合に、温度耐性が顕著に向上すること、最終到達酢酸濃度が顕著に向上することなどを見出し、更に該タンパク質のアミノ酸配列、及びそれをコードする遺伝子のDNAの塩基配列の決定にも成功し、本発明を完成するに至った。

図面の簡単な説明

図1

制限酵素SalIとKpnIを用いてクローニングされたグルコンアセトバクター・エンタニイ由来の遺伝子断片（pG1）の制限酵素地図とGCS遺伝子の

位置、及び p G C S、p G C S 1 への挿入断片の概略図。

図 2

G C S 遺伝子のコピー数を増幅した形質転換株の酢酸発酵経過を示す図面。

図 3

G C S 遺伝子のコピー数を増幅した形質転換株の酢酸発酵経過を示す図面。

図 4

G C S 遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列(配列番号 2)を示す。

図 5

プライマー 1 を示す。

図 6

プライマー 2 を示す。

図 7

本温度耐性遺伝子の塩基配列（配列番号 1）を示す。

図 8

p G I 1 8 の構築図。

図 9

p G I 1 8 の塩基配列（配列番号 5）を示す。

図 1 0

同上続きを示す。

図 1 1

同上続きを示す。

図 1 2

プライマー A を示す。

図 1 3

プライマー B を示す。

すなわち本発明は、下記の（1）～（10）を実施態様の例として提供するものである。

(1) 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 G C S。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、温度耐性を増強する機能を有するタンパク質。

(2) 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質をコードする新規遺伝子の DNA。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、温度耐性を増強する機能を有するタンパク質。

(3) 下記の (a)、又は (b) に示す DNA である上記 (2) に記載の遺伝子の DNA。

(a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 7 3 ~ 1 2 5 1 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 7 3 ~ 1 2 5 1 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、温度耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードする DNA。

(4) 上記 (2)、又は (3) に記載の DNA の細胞内のコピー数が増幅されたことにより、温度耐性が増強された微生物。

(5) 微生物がアセトバクター属、又はグルコンアセトバクター属の酢酸菌であることを特徴とする上記 (4) に記載の微生物。

(6) 上記 (4)、又は (5) に記載の微生物のうち、アルコール酸化能を有するものを、アルコールを含有する培地で培養して高い培養温度でも該培地中に酢酸を生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法。

(7) 少なくとも上記 (2)、又は (3) に記載の DNA を含んだ組換えプラスミド pUCGCS (FERM BP-8217)。

(8) 少なくとも配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する DNA 断片 (S

a l I - K p n I 断片)、又はそのコーディング領域 (塩基番号 73-1251) を含む PCR 増幅断片を、(7) のように大腸菌ベクター p T 7 B l u e ではなく、例えば、酢酸菌-大腸菌シャトルベクター p G I 1 8 (例えば、特許文献 2 参照) にそれぞれ挿入してなる組換えプラスミド p G 1、又は p G C S。

(9) 組換えプラスミド p G 1、又は p G C S をアセトバクター・アセチ (Acetobacter aceti) N o. 1023 (FERM B P-2287) に導入してなる形質転換体。

(10) 組換えプラスミド p G 1、又は p G C S をアセトバクター・アルトアセチゲネス (Acetobacter altoacetigenes) M H-24 (FERM B P-491) に導入してなる形質転換体。

本発明によれば、微生物に対して、温度に対する耐性を付与し、増強することができる、そして、アルコール酸化能を有する微生物、特に酢酸菌においては、温度に対する耐性が顕著に向上し、高温下においても酢酸を効率良く蓄積する能力を付与することができる。

発明の実施の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明の DNA

本発明の DNA は、温度耐性を向上させる機能を有する配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードし得る塩基配列を包含し、該塩基配列の調整要素、及び該遺伝子の構造部分を含む。更に詳細には、本発明は温度耐性遺伝子に関するものであって、本温度耐性遺伝子は、温度耐性及び／又は温度耐性向上に関与する遺伝子を指し、更に具体的には、少なくとも (i) 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列を有する DNA、又は (ii) それに含まれ、G C S タンパク質をコードする遺伝子 (G C S 遺伝子) の塩基配列、から選ばれる少なくともひとつを包含するものである。

本発明の DNA は、当業者に公知の方法で調製することができる。例えば、本明細書において具体的な塩基配列で示された DNA は、酢酸菌のゲノムを出発原料として用いて、例えば、ショットガン・クローニング法によって調製すること

ができる。その際、断片化された各染色体DNAは、その長さ等に応じて、プラスミドベクター又はファージ等の適当なクローニングベクターに連結し、これを用いてエレクトロポレーション法等の適当な方法によって酢酸菌等の適当な宿主細胞を形質転換し、該断片化各染色体DNAをクローニングする為の、クローンライブラリーを調製することができる。

更に、化学分解法（マキシムーギルバート法）及びジデオキシ法等の公知の方法に従って、かかるクローンライブラリーから得られる断片化各染色体DNAの塩基配列を決定することができる。

或いは、本明細書に記載された本発明DNAの塩基配列又はアミノ酸配列の情報に基づき、当業者の周知の化学合成、又は本発明のプライマーを使用したPCR法により増幅して調製することもできる。

例えば、本発明のDNAは、グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) の染色体DNAから次のようにして取得することができる。まず、グルコンアセトバクター・エンタニイ、例えばアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERM BP-491) の染色体DNAを取得する。染色体DNAの取得は、例えば特開昭60-9489号公報に開示された方法により行なうことができる。

次に、得られた染色体DNAから温度耐性を向上させる遺伝子を単離するために、染色体DNAライブラリーを作製する。すなわち、まず、染色体DNAを適当な制限酵素で部分分解して種々の染色体DNA断片混合物を得る。制限酵素としては、幅広い種類の酵素が使用でき、使用する酵素に応じて切断反応時間などを調節し、切断の程度を調節する。例えば、*Sau3AI* を温度30℃以上、好ましくは37℃、酵素濃度1～10ユニット/mlで様々な時間（1分～2時間）、染色体DNAに作用させてこれを消化する。なお、後記実施例では*SalI* と*KpnI* を用いた。

次いで、切断された染色体DNA断片を、酢酸菌内で自律複製可能なベクターDNAに連結する。具体的には、染色体DNAの切断に用いた制限酵素*SalI* と*KpnI* と相補的な末端塩基配列を生じさせる制限酵素、例えば、*SalI* と*KpnI* を、温度37℃、酵素濃度1～100ユニット/mlの条件下で、1

時間以上ベクターDNAに作用させてこれを完全消化し、切断開裂する。

切断開裂されたベクターDNAを、染色体DNA断片混合物と混合し、これに T_4 DNAリガーゼを作用させて、目的の組換えDNA (DNAライブラリー) を得ることができる。なお、 T_4 DNAリガーゼの作用条件としては、例えば、温度 4～16℃、酵素濃度 1～100 ユニット/ml の条件下で 1 時間以上、好ましくは 6～24 時間とすることができる。

得られた組換えDNAを用いて、通常は寒天培地上で 37℃でしか増殖することのできない酢酸菌、例えばアセトバクター・アセチ No. 1023 (*Acetobacter acetii* No.1023) 株 (FERM BP-2287) を形質転換し、38℃で培養する。生じたコロニーを液体培地に接種して培養し、得られる菌体からプラスミドを回収することで温度耐性遺伝子を含むDNA断片を得ることができる。

本発明のDNAとして、具体的には、配列表の配列番号1の塩基配列を有するDNAが挙げられるが、その内、塩基番号73～1251からなる塩基配列はコーディング領域である。

配列番号1に示す塩基配列及び配列番号2に示すアミノ酸配列 (図4：塩基番号73～1251に対応) は、DDBJ/EMBL/Genbank 及び SWISS-PROT/PIR において、ホモロジー検索をしたところ、アミノ酸配列レベルでメソリゾビウム・ロッティ (*Mesorhizobium loti*) のセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子と 41%、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子とも 39%の相同性を有することが分かったが、いずれも 40%程度の低い相同性であり、これらのタンパク質をコードする遺伝子とは異なる新規なものであることが明白であった。また、上記のセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子は、温度耐性と関係していることは全く知られていない。

また、本発明のDNAはその塩基配列が明らかとなったので、例えば、鋳型として酢酸菌のゲノムDNAを用い、該塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマーに用いるポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR 反応) によって、または該塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして用いるハイブリダイゼーションによっても得ることができる。

オリゴヌクレオチドの合成は、例えば、市販されている種々のDNA合成機を用いて定法に従って合成できる。また、PCR反応は、アプライドバイオシステムズ社（Applied Biosystems）製のサーマルサイクラー Gene Amp PCR System 9700 を用い、Taq DNAポリメラーゼ（タカラバイオ社製）やKOD-Plus（東洋紡績社製）などを使用して、定法に従って行なうことができる。

本発明の温度耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードするDNAは、コードされるタンパク質の温度耐性を増強する機能が損なわれない限り、1又は複数の位置で1又は数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加されたタンパク質をコードするものであっても良い。

このような温度耐性を増強する機能を有するタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸が欠失、置換、挿入、付加又は逆位されるように塩基配列を改変することによっても取得され得る。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている突然変異処理によっても取得することができる。

また、一般的にタンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードする塩基配列は、種間、株間、変異体間、変種間でわずかに異なることが知られているので、実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、酢酸菌全般、中でもアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の種、株、変異体、変種から上記のタンパク質をコードするDNAを得ることが可能である。

具体的には、アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌、又は変異処理したアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌、これらの自然変異株若しくは変種から、例えば配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基配列番号73～1251からなる塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、温度耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、該タンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。

ここでいうストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例え

ば70%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のハイブリダイゼーションの洗浄条件、例えば1×SSCで0.1% SDSに相当する塩濃度にて60℃で洗浄が行なわれる条件などが挙げられる。

温度耐性を増強する機能を有することの確認は、例えば、後述の実施例で説明するように、通常は寒天培地上で37℃程度でしか増殖することができないアセトバクター・アセチNo.1023株 (FERM BP-2287) に目的のDNAを形質転換し、38℃で増殖可能かどうかを調べることにより行なうことができる。

(2) 本発明の酢酸菌

本発明の酢酸菌はアセトバクター属及びグルコンアセトバクター属の細菌を指し、温度耐性が増強されたアセトバクター属細菌及びグルコンアセトバクター属である。

アセトバクター属細菌として具体的には、アセトバクター・アセチ (*Acetobacter aceti*) が挙げられ、具体的には例えば、アセトバクター・アセチNo. 1023 (*Acetobacter aceti* No.1023) 株 (特許生物寄託センターにFERM BP-2287として寄託)、アセトバクター・アセチ・サブスピーシズ・ザイリナム IFO3288 (*Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* IFO3288) 株、アセトバクター・アセチ IFO3283 (*Acetobacter aceti* IFO3283) 株が例示される。

また、グルコンアセトバクター属細菌としては、例えば、グルコンアセトバクター・ユウロパエウス DSM6160 (*Gluconacetobacter europaeus* DSM6160)、グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) が挙げられ、具体的には例えば、アセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (特許生物寄託センターにFERM BP-491として寄託) が例示される。

温度耐性の増強は、例えば温度耐性遺伝子の細胞内のコピー数を増幅すること、又は、該遺伝子の構造遺伝子を含むDNA断片をアセトバクター属細菌中で効率良く機能するプロモーター配列に連結して得られる組換えDNAを用いて、アセトバクター属細菌を形質転換することによって増強することができる。

また、染色体DNA上の該遺伝子のプロモーター配列を、アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の細菌中で効率よく機能する他のプロモーター配列、例えば酢酸菌のアルコールデヒドロゲナーゼ（例えば、非特許文献8参照）、大腸菌のプラスミドpBR322のアンピシリン耐性遺伝子、プラスミドpACYC177のカナマイシン耐性遺伝子、プラスミドpACYC184のクロラムフェニコール耐性遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子などの各遺伝子のプロモーターなどの酢酸菌以外の微生物由来のプロモーター配列に置き換えることによって、温度耐性を増強することができる。

該遺伝子の細胞内コピー数の増幅は、該遺伝子を保持するマルチコピーベクターをアセトバクター属細菌の細胞に導入することによって行なうことができる。すなわち、該遺伝子を保持するプラスミド、トランスポゾン等をアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の細菌の細胞に導入することによって行なうことができる。

マルチコピーベクターとしては、プラスミド、トランスポゾン等が挙げられる。プラスミドとしては、pMV24（例えば、非特許文献3参照）、pGI18（例えば、特許文献2参照）、pUF106（例えば、非特許文献7参照）、pTA5001（A）、pTA5001（B）（例えば、特許文献1参照）などが挙げられる。また、染色体組み込み型ベクターであるpMVL1（例えば、非特許文献4参照）も用いることができる。トランスポゾンとしては、MuやIS1452などが挙げられる。

アセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌へのDNAの導入は、塩化カルシウム法（例えば、非特許文献5参照）、エレクトロポレーション法（例えば非特許文献6参照）等によって行なうことができる。

アルコール酸化能を有するアセトバクター属やグルコンアセトバクター属の酢酸菌において、上記のようにしてその温度耐性を増強すると、酢酸の生産効率を増大させることができる。

（3）食酢製造方法

本発明の食酢の製造方法は、温度耐性遺伝子のコピー数が増幅されたことにより温度耐性が選択的に増強されたアセトバクター属やグルコンアセトバクター属

の細菌でありアルコール酸化能を有する微生物を、アルコールを含有する培地で培養して該培地中に酢酸を生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法である。

この方法は、従来の酢酸菌による発酵方法と同様に行なえば良い。アルコールを含有する培地とは、エタノール等のアルコールと、炭素源、窒素源、無機物等を含有する培地であり、いわゆる酢酸発酵の際に用いられる培地と同様の組成のものを使用することができる。必要に応じて、使用菌株が生育に要求する栄養源を適当量含有するものであれば、合成培地でも天然培地でも良い。炭素源としては、グルコースやシュクロースをはじめとする各種炭水化物、各種有機酸等を用いることができる。窒素源としては、ペプトン、発酵菌体分解物などの天然窒素源を用いることができる。

また、培養は、静置培養法、振とう培養法、通気攪拌培養法等の常法に従って、好氣的条件下で行なうことができる。培養温度は20～40℃、好ましくは25～35℃、通常は30℃とすることができる。培地のpHは通常2.5～7.0の範囲であり、2.7～6.5の範囲が好ましく、各種の酸、塩基、緩衝液等によって適宜調整することができる。

このように、本発明においては、アルコールを含有する培地で培養して該培地中に酢酸を生成蓄積せしめることができ、通常1～21日間の培養によって、培地中に高濃度の酢酸を生成蓄積せしめることができる。

(4) 本発明の実施形態

本発明に係るORF（配列番号1において、配列番号73～1251：GCS遺伝子）又はそれを含有する温度耐性遺伝子（配列番号1）の一部を大腸菌ベクター（マルチコピーベクター）pT7Blue（Novagen社製）に挿入してなる組換えプラスミドpUCGCSは、特許生物寄託センターにFERM BP8217として寄託されているので、本発明に係る遺伝子のDNAは容易に入手することができ、当業者であれば本発明の実施は容易である。そして、所望するのであれば、この組換えプラスミドを用いて、本発明に係るORF又はそれを含有する温度耐性遺伝子を、酢酸菌で自律複製可能なベクターに乗せ換え、これを酢酸菌に導入し、該酢酸菌を培養することにより、高温条件下においても酢酸発

酵を行なうことができ、冷却コストを低減させることができる。

さらに、上記したようにそしてまた後記する実施例からも明らかなように、温度耐性増強遺伝子源の寄託、該遺伝子の塩基配列、それに対応するタンパク質のアミノ酸配列、PCR様態、プラスミドベクター、組換えプラスミドの作製、宿主菌の寄託、その他が明らかにされており、いずれも入手ないし操作、処理が容易に行なえるので、実施例を参考にして各操作、処理を行なえば、目的とする温度耐性形質転換体を得ることができ、これを使用することにより、高温条件下においても、酢酸を製造することができる。

以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例

(実施例1) グルコンアセトバクター・エンタニイからの温度耐性遺伝子のクローニングと塩基配列及びアミノ酸配列の決定

(1) 染色体DNAライブラリーの作製

グルコンアセトバクター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) の1株であるアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERM BP-491) を、6%酢酸と4%エタノールを添加したYPG培地(3%グルコース、0.5%酵母エキス、0.2%ポリペプトン含有)中で、30℃にて240~336時間振とう培養を行なった。培養終了後、培養液を遠心分離(7,500×g、10分)し、菌体を得た。得られた菌体より、特開昭60-9489号公報に開示された方法により、染色体DNAを調製した。

上記のようにして得られた染色体DNA及び大腸菌-酢酸菌シャトルベクターpMV24を、制限酵素SalI-KpnI(タカラバイオ社製)で消化して、切断した。これらのDNAを適量ずつ混合し、ライゲーションキット(TaKaRa DNA Ligation Kit Ver.2、タカラバイオ社製)を用いて連結してアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24の染色体DNAライブラリーを構築した。

(2) 温度耐性遺伝子のクローニング

上記のようにして得られたアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24の染色体DNAライブラリーを、通常は寒天培地上で生育温度37℃程度までしか増殖できないアセトバクター・アセチNo. 1023株 (FERM BP-2287) に形質転換した。その後、形質転換されたアセトバクター・アセチNo. 1023株を、100 μ g/ml のアンピシリンを加えたYPG寒天培地で、38℃にて4日間培養した。

次に、生じたコロニーを100 μ g/ml のアンピシリンを含むYPG培地に接種して培養し、得られた菌体からプラスミドを回収した。その結果、図1に示すように、約1.6 kbpのSalI-KpnI断片がクローン化されたプラスミドを回収できた。このプラスミドを、pG1と命名した。

このようにして、通常は寒天培地上で37℃程度までしか増殖出来ないアセトバクター・アセチNo. 1023株を、38℃でも増殖可能にする温度耐性増強遺伝子断片を取得した。

(3) クローン化されたDNA断片の塩基配列及びアミノ酸配列の決定

上記のクローン化されたSalI-KpnI断片を、pUC19のSalI-KpnI切断部位に挿入し、該断片の塩基配列を、サンガーのダイデオキシ・チェーン・ターミネーション法によって決定した。なお、塩基配列の決定は、DNA2本鎖の両方の全領域について行ない、切断点は全てオーバーラップする様に行なった。

その結果、配列表の配列番号1記載の塩基配列が決定された。配列表の配列番号1記載の塩基配列中には、塩基番号73～1251にかけて、配列表の配列番号2記載のアミノ酸393個からなるアミノ酸配列をコードするオープンリーディング・フレーム (ORF) の存在が確認された。

(実施例2) グルコンアセトバクター・エンタニイ由来の温度耐性遺伝子で形質転換した形質転換株での温度耐性の増強

(1) アセトバクター・アセチへの形質転換

上記実施例1のようにしてクローン化されたアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERM BP-4

91) 由来の温度耐性増強遺伝子を、KOD-Plus (東洋紡績社製) を用いてPCR法によって増幅した。酢酸菌-大腸菌シャトルベクターpMV24 (例えば、非特許文献3参照) を制限酵素SmaI切断部位に挿入してpGCSを作製した。pGCSに挿入された増幅断片の概略を、図1に示した。この増幅断片は、SalI-KpnI断片 (温度耐性向上遺伝子: その塩基配列を配列番号1に示す) 内に含まれ、塩基番号73~1251のコーディング領域 (ORF) の上流及び下流領域の一部を包含するものである。

PCR法は次のようにして実施した。すなわち、鋳型として上記酢酸菌由来のゲノムDNAを用い、プライマーとしてプライマー1 (その塩基配列を配列番号3 (図5) に示す) 及びプライマー2 (その塩基配列を配列番号4 (図6) に示す) を用い、下記する条件にて、PCR法を実施した。

(PCR条件)

PCR法のサイクルは、94℃15秒、60℃30秒、68℃2分を1サイクルとして、30サイクルとした。

このpGCSをアセトバクター・アセチNo. 1023株 (FERM BP-2287) にエレクトロポレーション法 (例えば、非特許文献6参照) によって形質転換した。形質転換株は100 µg/mlのアンピシリンを添加したYPG寒天培地で、培養温度を38℃で培養することにより選択した。

選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株は、定法によりプラスミドを抽出して解析し、温度耐性遺伝子(GCS 遺伝子)を保有するプラスミドを保持していることを確認した。

(実施例3) グルコンアセトバクター・エンタニイ由来の温度耐性遺伝子で形質転換した形質転換株の酢酸発酵試験

(1) 形質転換株の温度耐性

実施例2で得られたプラスミドpGCSを有するアンピシリン耐性の形質転換株について、培養温度を変化させたYPG培地での生育を、シャトルベクターpMV24のみを導入した元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と比較した。

具体的には、2 Lのミニジャー（三ツワ理化学工業社製；KMJ-2A）を用いて、酢酸1%、エタノール4%、アンピシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む1 LのYPG培地にて、400 rpm、0.2vvmの通気攪拌培養を行ない、形質転換株と元株の培地中の酢酸濃度と、各株の生育を660 nmにおける吸光度を測定することで比較した。培養温度は初めに30℃で、次に33℃で酢酸濃度約3%まで発酵させ、更に36℃まで上げて酢酸濃度を3%まで発酵させ、その後、温度を2℃ずつ上げて酢酸発酵を実施した。酢酸濃度が3%に達した際は、約100 mlの培養液をミニジャー中に残して培養液を取り出し、残った100 mlに対して酢酸1%、エタノール4%、アンピシリン $100\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように900 mlのYPG培地を添加し、温度を上記のように変更の後、再び酢酸発酵を開始させた。

その結果、図2に示すように、元株アセトバクター・アセチNo. 1023株では37℃までしか増殖せず、酢酸発酵が行なわれないのに対して、形質転換株では38℃でも増殖して酢酸発酵が可能であり、更に40℃においても増殖が認められる結果が得られ、GCS遺伝子の温度耐性増強機能が確認できた。

（実施例4）グルコンアセトバクター・エンタニイ由来の温度耐性遺伝子で形質転換した形質転換株での温度耐性の増強

（1）アセトバクター・アセチへの形質転換

上記実施例1のようにしてクローン化されたアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERM BP-491) 由来の温度耐性増強遺伝子を、KOD-Plus（東洋紡績社製）を用いてPCR法によって増幅した。酢酸菌-大腸菌シャトルベクターpGI18（例えば、特許文献2参照）を制限酵素Sma I 切断部位に挿入したpGCS1を作製した。pGCS1に挿入された増幅断片の概略を、図1に示した。この増幅断片は、Sal I-Kpn I断片（温度耐性向上遺伝子：その塩基配列を配列番号1に示す）内に含まれ、塩基番号73～1251のコーディング領域（ORF）の上流及び下流領域の一部を包含するものである。

PCR法は次のようにして実施した。すなわち、鋳型として上記酢酸菌由来の

ゲノムDNAを用い、プライマーとしてプライマー1（その塩基配列を配列番号3（図5）に示す）及びプライマー2（その塩基配列を配列番号4（図6）に示す）を用い、下記する条件にて、PCR法を実施した。

（PCR条件）

PCR法のサイクルは、94℃15秒、60℃30秒、68℃2分を1サイクルとして、30サイクルとした。

このpGCS1をアセトバクター・アセチNo. 1023株（FERM BP-2287）にエレクトロポレーション法（例えば、非特許文献6参照）によって形質転換した。形質転換株は100 µg/mlのアンプシリンを添加したYPG寒天培地で、培養温度を38℃で培養することにより選択した。

選択培地上で生育したアンプシリン耐性の形質転換株は、定法によりプラスミドを抽出して解析し、GCS 遺伝子を保有するプラスミドを保持していることを確認した。

なお、酢酸菌用ベクターpGI18は、図8に示した手順にて作製した。

すなわち、このベクターpGI18は、プラスミドpGI1とpUC18とから作製した。先ず、プラスミドpGI1を作製した。

即ち、グルコンアセトバクター・エンタニイ（*Glucanacetobacter entanii*）の1株であるアセトバクター・アルトアセチゲネスMH-24株（*Acetobacter altoacetigenes* MH-24）（FERM BP-491）を、6%酢酸と4%エタノールを添加したYPG培地（3%グルコース、0.5%酵母エキス、0.2%ポリペプトン含有）中で、30℃にて240時間から336時間振とう培養した。得られた菌体について水酸化ナトリウムやドデシル硫酸ナトリウムを用いて溶菌後、フェノール処理し、更にエタノールによりプラスミドDNAを精製した。

得られたプラスミドDNAを、各種制限酵素（タカラバイオ社製）で切断し（37℃、酵素濃度1ユニット/ml）、得られたDNA断片の塩基対長をアガロースゲル電気泳動により求めた。

得られたプラスミドDNAはHincIIで3カ所、また、SfiIで1カ所

の認識部位を有する環状二本鎖DNAプラスミドであり、プラスミド全体の長さは約3100塩基対(bp)であった。また、EcoRI、SacI、KpnI、SmaI、BamHI、XbaI、SalI、PstI、SphI、HindIIIの認識部位を有していなかった。得られたプラスミドDNAをプラスミドpGI1と命名し、ベクターpGI18の作製に用いた(図8)。

上記で得られたプラスミドpGI1を、KOD-Plus(東洋紡績社製)を用いてPCR法によって増幅し、AatIIで切断した。

PCR法は、次のようにして実施した。すなわち、実施例1で調製したプラスミドpGI1を鋳型として、プライマーとしてAatII認識部位を有するプライマーA及びプライマーBを用い、下記する条件にて、PCR法を実施した。プライマーA及びプライマーBの塩基配列は、それぞれ配列表の配列番号6(図12)及び配列番号7(図13)に示す通りである。

PCRの条件は、94℃30秒、60℃30秒、68℃3分を1サイクルとして、30サイクルとした。

一方、アンピシリン(Amp)耐性遺伝子を担うpUC18(タカラバイオ社製:2686bp)をAatIIで切断し(37℃、酵素濃度1ユニット/ml)、T₄DNAリガーゼで、上記で得られたプラスミドpGI1に連結反応(Ligation)させた。連結後の反応液を、常法に従い、大腸菌JM109株(タカラバイオ社製)に形質転換し、100μg/mlのアンピシリンナトリウムを含むLB培地(トリプトン10g、酵母エキス5g、NaCl5g/リットル)プレート上で選択してAmp耐性の形質転換株を得た。得られた形質転換株よりプラスミドを調製し、その制限酵素切断パターンを解析した。図8に、得られたプラスミドの制限酵素地図を示す。図8中、「AatII」及び「SfiI」は、制限酵素認識部位を示す。また、MCSは、マルチクローニングサイトを、Amp^rは、アンピシリン耐性遺伝子部位を、括弧内の数字は、bp単位で示した塩基番号を示す。更に、中央の「pUC18」「pGI1」及び「pGI18」は、プラスミド名を、「2.7kbp」、「3.1kbp」及び「5.8kbp」は、プラスミドの総塩基数を示す。

図8から明らかなように、得られたプラスミドはpUC18およびpGI1の

いずれをも含有して、全体の長さは約5800塩基対(5.8kbp)であった。このプラスミドを酢酸菌用ベクターpGI18と命名した。

このベクターpGI18の塩基配列を配列番号5(図9、図10、図11)に示す。

(2) 形質転換株の温度耐性

上記のようにして得られたプラスミドpGCS1を有するアンピシリン耐性の形質転換株について、培養温度を変化させたYPG培地での生育を、シャトルベクターpGI18のみを導入した元株アセトバクター・アセチNo. 1023株と比較した。

具体的には、2Lのミニジャー(三ツワ理化学工業社製;KMJ-2A)を用いて、酢酸1%、エタノール4%、アンピシリン100 μ g/mlを含む1LのYPG培地にて、400rpm、0.2vvmの通気攪拌培養を行ない、形質転換株と元株の培地中の酢酸濃度と、各株の生育を660nmにおける吸光度を測定することで比較した。培養温度は初めに30℃で、次に33℃で酢酸濃度約3%まで発酵させ、更に36℃まで上げて酢酸濃度を3%まで発酵させ、その後、温度を2℃ずつ上げて酢酸発酵を実施した。酢酸濃度が3%に達した際は、約100mlの培養液をミニジャー中に残して培養液を取り出し、残った100mlに対して酢酸1%、エタノール4%、アンピシリン100 μ g/mlになるように900mlのYPG培地を添加し、温度を上記のように変更の後、再び酢酸発酵を開始させた。

その結果、図3に示すように、元株アセトバクター・アセチNo. 1023株では37℃までしか増殖せず、酢酸発酵が行なわれないのに対して、形質転換株では38℃でも増殖して酢酸発酵が可能であり、更に40℃においても増殖が認められる結果が得られ、GCS遺伝子の温度耐性増強機能が確認できた。

(実施例5) グルコンアセトバクター・エンタニイ由来の温度耐性遺伝子で形質転換した形質転換株での酢酸発酵試験

(1) アセトバクター・アルトアセトゲネスへの形質転換

(実施例4)のようにして得られたプラスミドpGCS1をグルコンアセトバ

クター・エンタニイ (*Gluconacetobacter entanii*) の1株であるアセトバクター・アルトアセトゲネスMH-24 (*Acetobacter altoacetigenes* MH-24) 株 (FERM BP-491) にエレクトロポレーション法 (例えば、非特許文献6参照) によって形質転換した。形質転換株は100 μ g/mlのアンプシリン及び4%の酢酸と4%のエタノールを添加した0.55%の寒天を含んだYPG寒天培地で選択した。

選択培地上で生育したアンプシリン耐性の形質転換株について、定法によりプラスミドを抽出して解析し、温度耐性増強遺伝子を保有するプラスミドを保持していることを確認した。

(2) 酢酸発酵試験

(1) で得られたプラスミドpGCS1を有するアンプシリン耐性の形質転換株について、シャトルベクターpGI18のみを導入した元株アセトバクター・アルトアセトゲネスMH-24株と酢酸発酵能を比較した。

具体的には、5Lのミニジャー (三ツワ理化学工業社製; KMJ-5A) を用いて、アンプシリン100 μ g/mlを含む2.5Lの原料培地 (酢酸7%、エタノール3%、酵母エキス0.2%、グルコース0.2%) にて、30℃、500 rpm、0.20 vvmの通気攪拌培養を行なった。菌体の明らかな増殖が認められ、残留エタノール濃度が2%になった段階で、エタノール含有液 (酢酸1%、エタノール50%、酵母エキス0.2%、グルコース0.2%) を流加し、発酵液のエタノール濃度が2%になるように制御した。この酢酸発酵をさせる方法で、形質転換株と元株の酢酸発酵能を比較した。その結果を表1にまとめた。

(表 1)

| | 最終到達酢酸濃度 (%) | 比増殖速度 (OD660/h r) | 生産速度 (%/h r) |
|-------|-----------------|-------------------------|-----------------|
| 元株 | 15.6 | 0.0061 | 0.31 |
| 形質転換株 | 17.2 | 0.0061 | 0.26 |

表 1 の結果から、形質転換株の方が、最終到達酸度において顕著にすぐれていることが確認できた。

(3) アセトバクター・アセチ・サブスピーシズ・ザイリナムへの形質転換

(実施例 4) のようにして得られたプラスミド pGCS1 をアセトバクター・アセチ・サブスピーシズ・ザイリナム (*Acetobacter acetii* subsp. *xylinum*) の 1 株であるアセトバクター・アセチ・サブスピーシズ・ザイリナム IFO3288 (*Acetobacter acetii* subsp. *xylinum* IFO3288) 株にエレクトロポレーション法 (例えば、非特許文献 6 参照) によって形質転換した。形質転換株は 100 μ g/ml のアンピシリンを添加した YPG 寒天培地で選択した。

選択培地上で生育したアンピシリン耐性の形質転換株について、定法によりプラスミドを抽出して解析し、温度耐性増強遺伝子を保有するプラスミドを保持していることを確認した。

(4) 酢酸発酵試験

(3) で得られたプラスミド pGCS1 を有するアンピシリン耐性の形質転換株について、シャトルベクター pGI18 のみを導入した元株アセトバクター・アセチ・サブスピーシズ・ザイリナム IFO3288 株と酢酸発酵能を比較した。

具体的には、米糖化液を 17.9%、発酵諸味を 3.2%、醸造用アルコールを 7.8%、水を 71.1% の割合で混合して作成した原料培地 (アルコール濃度 7.8%、酢酸濃度 0.26%) を用いて、5 L のミニジャー (三ツワ理化学工業社製; KMJ-5A) において、30℃、500 rpm、0.20 vvm の通気攪拌培養を行ない、酢酸濃度 7.2% での連続発酵を行なった。酢酸濃度 7.2% の連続発酵での原料培地の添加速度を比較し、その結果を表 2 に示した。また、形質転換株の原料培地添加速度を元株の酢酸濃度 7.2% での連続発酵時

の原料培地添加速度に合わせた場合の酢酸発酵能を比較し、その結果を表 3 に示した。

(表 2)

| | 酢酸濃度 (%) | OD660 | 原料培地添加速度 (g/h r) |
|-------|----------|----------|---------------------|
| 元株 | 7. 1 7 | 0. 5 3 8 | 8 4. 7 |
| 形質転換株 | 7. 2 6 | 0. 6 1 2 | 9 6. 3 |

(表 3)

| | 酢酸濃度 (%) | OD660 | 原料培地添加速度 (g/h r) |
|-------|----------|----------|---------------------|
| 元株 | 7. 2 4 | 0. 5 0 2 | 8 2. 3 |
| 形質転換株 | 7. 6 1 | 0. 4 3 7 | 8 2. 0 |

表 2、及び表 3 の結果から、形質転換株の方が、連続酢酸発酵においても、生産性（原料培地添加速度）と生産酢酸濃度においても顕著にすぐれていることが確認できた。

発明の効果

本発明により、温度耐性に関与する新規な遺伝子が提供され、さらに該遺伝子を用いてより高温条件下での食酢を高効率で製造可能な育種株を取得することができ、該育種株を用いたより高温条件下での食酢を高効率で製造する方法が提供することができた。

請 求 の 範 囲

- 1 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 G C S。
 - (A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
 - (B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、温度耐性を増強する機能を有するタンパク質。
- 2 下記の (A)、又は (B) に示すタンパク質 G C S をコードする遺伝子の DNA。
 - (A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。
 - (B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、温度耐性を増強する機能を有するタンパク質。
- 3 下記の (a)、又は (b) に示す DNA である上記 2 に記載の遺伝子の DNA。
 - (a) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 7 3 ~ 1 2 5 1 からなる塩基配列を含む DNA。
 - (b) 配列表の配列番号 1 に記載の塩基配列のうち、塩基番号 7 3 ~ 1 2 5 1 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、温度耐性を増強する機能を有するタンパク質をコードする DNA。
- 4 上記 2、又は 3 に記載の DNA の細胞内のコピー数が増幅されたことにより、温度耐性が増強された微生物。
- 5 微生物がアセトバクター属、又はグルコンアセトバクター属の酢酸菌であることを特徴とする上記 4 に記載の微生物。
- 6 上記 4、又は 5 に記載の微生物のうち、アルコール酸化能を有するものを、アルコールを含有する培地で培養して高い培養温度でも該培地中に酢酸を生成蓄積せしめることを特徴とする食酢の製造方法。
- 7 少なくとも上記 2、又は 3 に記載の DNA を含んだ組換えプラスミド p U

CGCS (FERM BP-8217)。

図 1

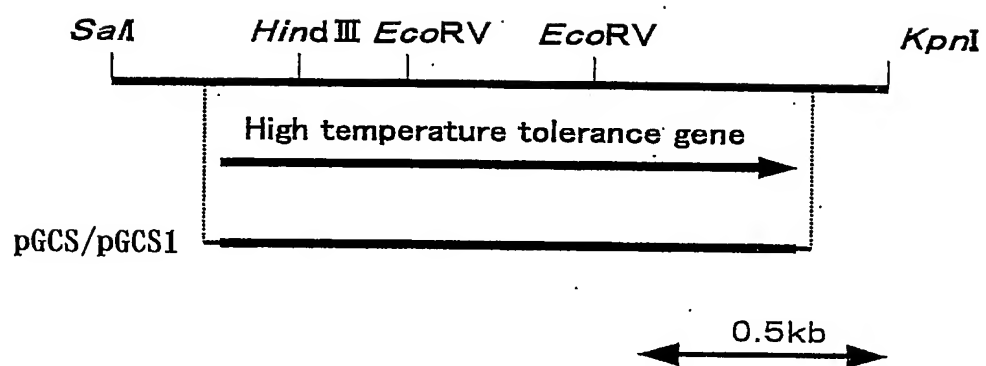


図 2

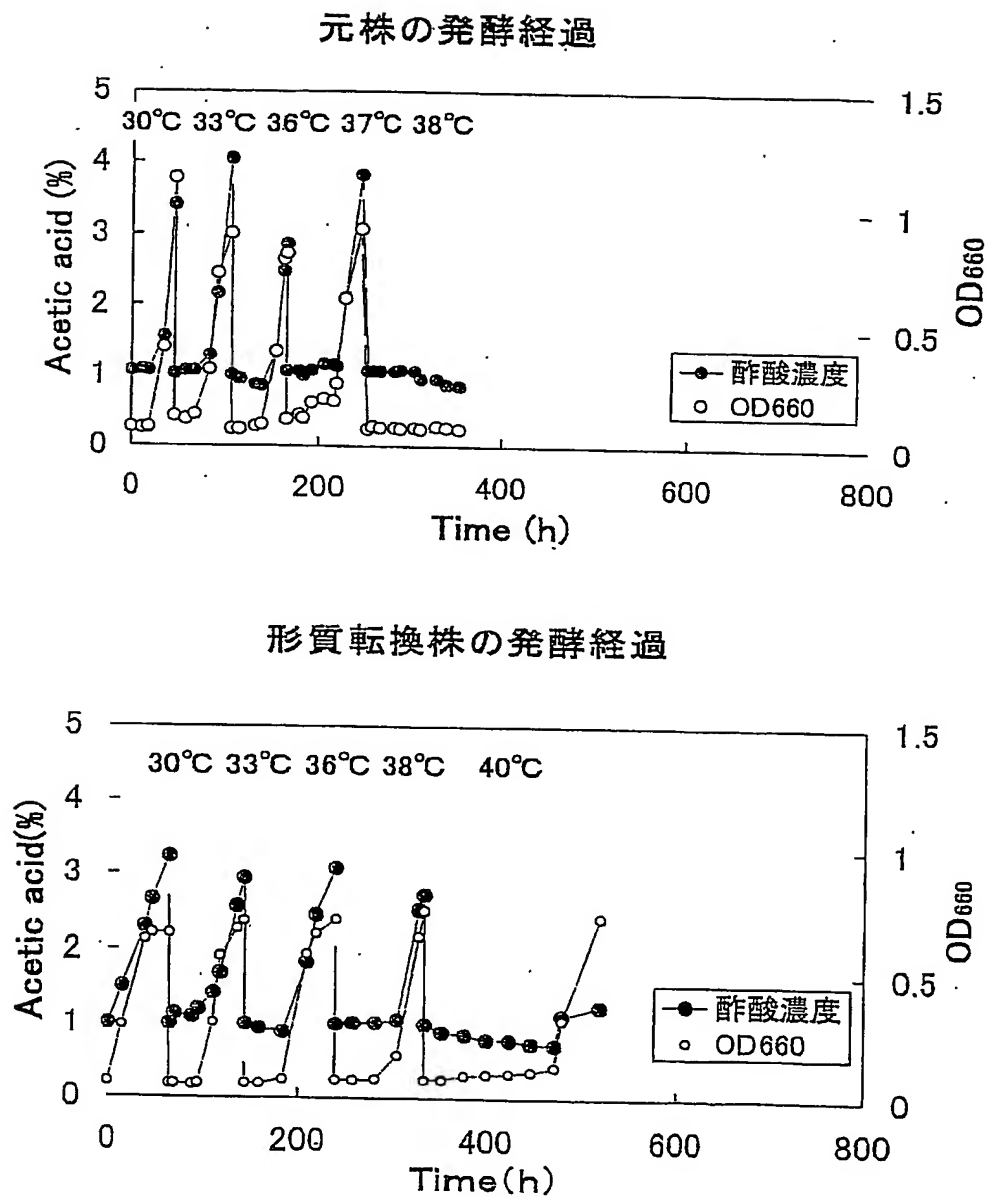


図 3

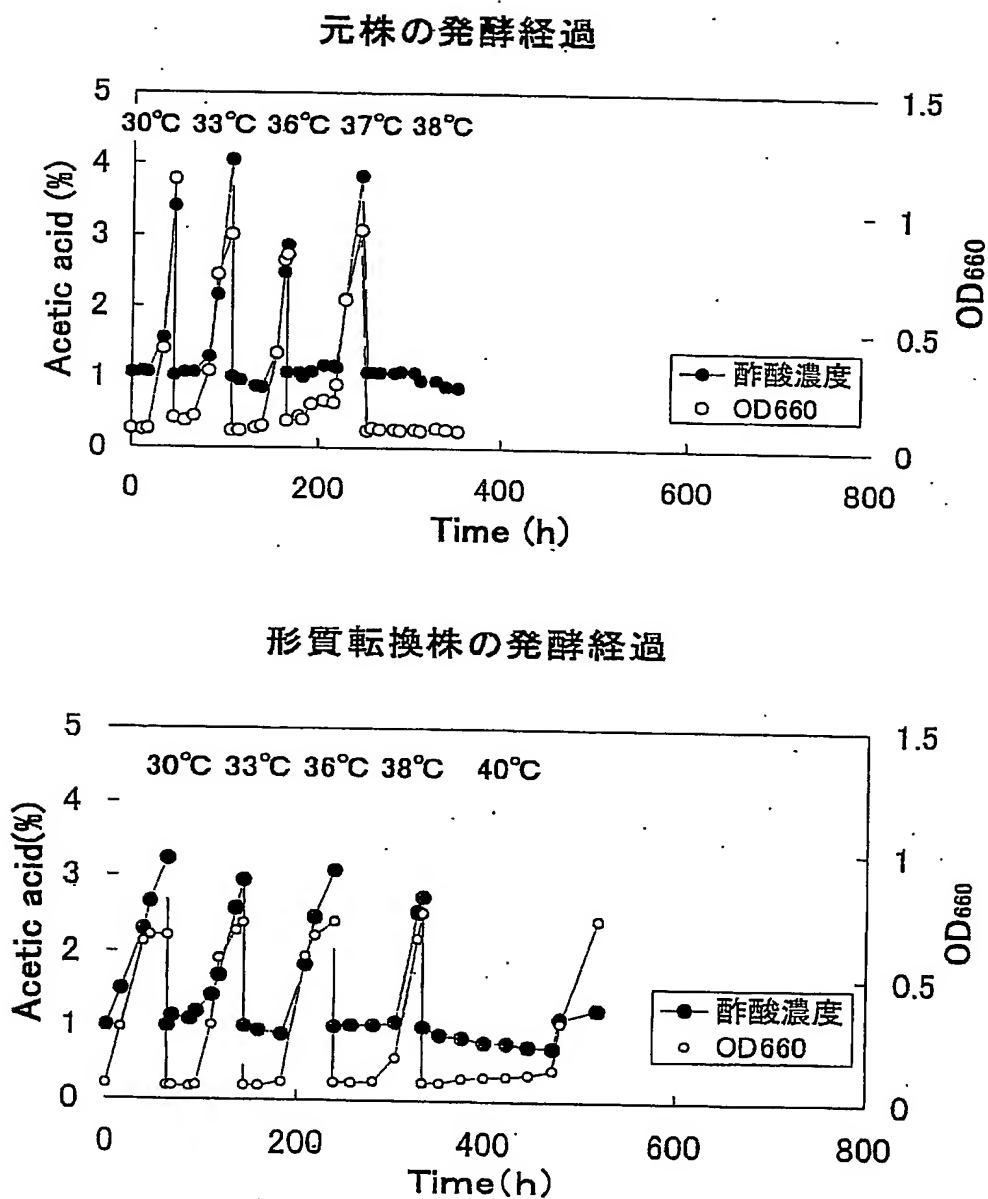


図 4

MetSerValPheAsnAlaLeuValSerPro AlaGlyLeuAlaAlaThrValAlaValAla 20
 GlyCysMetGlnAlaAlaLeuGlyThrPhe LeuValSerArgPheArgTrpGlnGluLys 40
 ArgMetAspArgAlaValProMetProPro ValSerValLeuLysProLeuHisGlyAsp 60
 GluProLeuLeuGluGluAlaLeuGluSer PheCysThrGlnAspTyrProGlnMetGln 80
 IleValPheGlyValGlnAlaGluAspAsp AlaAlaIleProIleValGlnArgLeuMet 100
 GluArgHisProAspValGlnMetGluLeu ValIleAspProThrPheHisGlyLeuAsn 120
 ArgLysIleGlyAsnLeuIleAsnIleMet ThrArgValLysHisAspValLeuValIle 140
 SerAspSerAspIleHisValAlaProAsp TyrLeuArgHisValValGlyAlaMetVal 160
 ProAspAsnValGlyLeuValThrThrLeu TyrAlaGlyLeuProAlaSerSerThrLeu 180
 ProArgLeuLeuAlaAlaCysGlnIleAsn HisAsnPheLeuProGlyValMetLeuSer 200
 LeuTyrLeuGlyArgGlnAspCysLeuGly AlaThrMetAlaLeuArgArgSerMetLeu 220
 AspGluIleGlyGlyLeuGluAlaLeuVal ProHisValAlaAspAspAlaIleLeuGly 240
 ArgTyrValArgAspArgGlyLysAspIle AlaIleAlaAlaCysMetThrTrpThrThr 260
 ValGlyGluThrSerMetArgGluValLeu AlaHisGluLeuArgTrpGlyArgThrVal 280
 LysThrLeuGluProAlaGlyTyrAlaAla SerAlaIleGlnLeuProLeuPheTrpAla 300
 SerValAlaValLeuAlaAlaProHisAla ThrTrpThrTrpSerPhePheLeuGlyAla 320
 TrpGlyTrpArgAlaValCysSerPheIle LeuAspArgThrLeuAlaGlnArgSerLeu 340
 ValLeuProSerLeuLeuLeuProLeuArg AspTrpIleSerAlaAlaValMetValGly 360
 SerValThrGlyThrArgValAlaTrpArg GlyGlnThrMetHisValThrProHisSer 380
 ValMetThrProArgSerGlnProAlaSer ProGlyAsp 393

図 5

5' -GAAGAGTGATATTACACTTCCCTGACGCCG-3'

図 6

5' -CCCGTTCTTATTAAACGACAGGGTTGG-3'

図 7

| | |
|--|------|
| gaagagtgat attacacttc cctgacgccg ttttctaatt tgctccatac gōgggacctt | 60 |
| gccggaaaga taatgtctgt tttcaacgct cttgtttcac ccgccggact ggccgcgacc | 120 |
| gttgcggtcg ccgggtgcat gcaggcagcg cttggcactt ttctggtctc gcgtttccgg | 180 |
| tggcaggaaa aacgcatgga ccgggcggtg cccatgcctc cggtttccgt gctcaagccc | 240 |
| ctccacggcg atgaaccgct gctggaggaa gcgcttgaaa gcttctgcac gcaggattac | 300 |
| ccgcagatgc agatcgtctt tggcgtacag gccgaagacg atgcggcgat cccgatcgta | 360 |
| caacggttga tggaaaccca ccgggatgtg cagatggaac tggtgattga cccaccttc | 420 |
| cacgggctca accgcaagat cggcaacctg atcaacatca tgacgcgcgt gaagcatgat | 480 |
| gtcctggtca tttccgattc ggatatccac gttgcccccg attacctgcg gcatgtggtg | 540 |
| ggcgccatgg tgcccgacaa tgcggcctg gtcacgacgc tgtacgggg gctgcccgcg | 600 |
| tcattcacgc tgccggcctt gctggccgca tgccagatca accataactt cctgccggcg | 660 |
| gtgatgctgt cactctacct cgggcggcgag gactgccttg gggcgacaat ggcgctgcgg | 720 |
| cgttccatgc tggacgaaat cggcgggctg gaagccctcg tgccgcatgt ggccgatgat | 780 |
| gcgatactgg gccgttacgt gcgtgacctt ggcaaggata tcgccattgc cgcgtgcatg | 840 |
| acctggacca ccgtgggcga gacctgatg cgtgaggtgc tggcgcatga actgcgtgg | 900 |
| ggccggaccg tcaagacgct ggagcctgcg ggttatgccg catccgccat ccagctgccc | 960 |
| ctgttctggg ccagcgtcgc cgtgcttgcc gcgccgatg cgacctggac atggtccttc | 1020 |
| tttcttggtg catggggatg gcgggcgctg tgttccttca tcctggaccg tacgtggcg | 1080 |
| caacgtagtc tgggtctgcc gtcactgctt ctgccactgc gcgactggat ctcgccgcc | 1140 |
| gtcatggtgg gcagtgtcac tggcacgcgg gttgcatggc gtgggcagac aatgcatgtc | 1200 |
| acgccccatt cggcatgac accacgatcg caacggctt cccccggtga ctgaccgcc | 1260 |
| gtcagcaggc tgaactgctt gagaattcca accctgtcgt taataagaac ggg | 1313 |

図 8

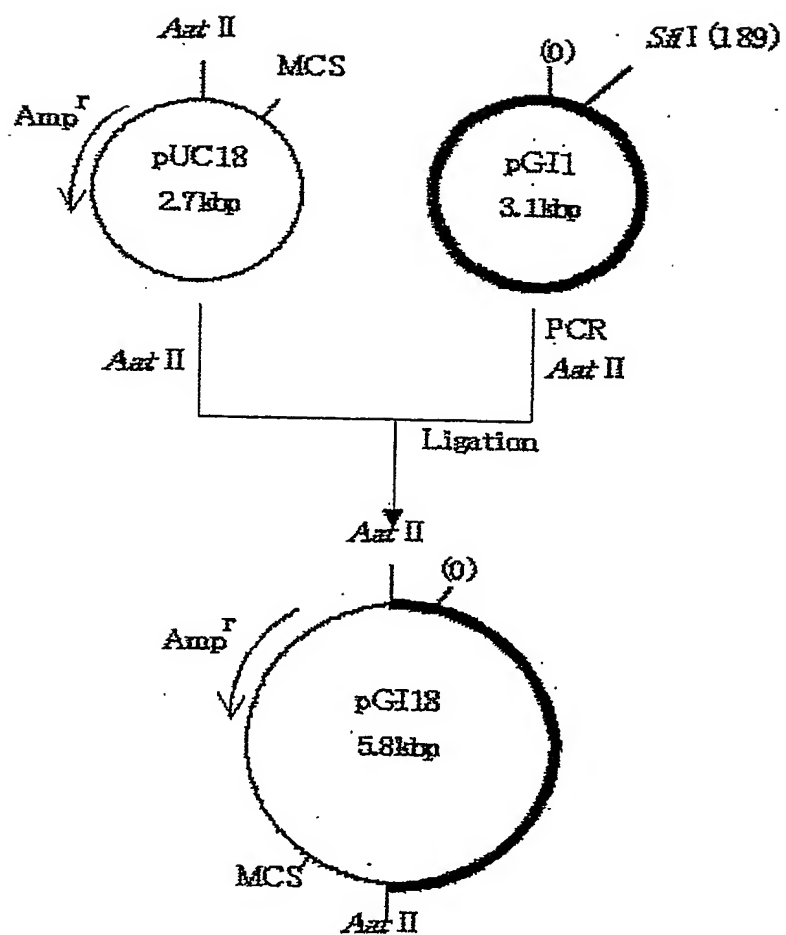


図 9

| | |
|--|------|
| catggggcgt cacccccagc ggccagcttg gctacctgat ggacagggcg ggccttctgc | 60 |
| aagccctcgg ccactgccat ctgccgggat atgaggccaa atacgaaccg aaggaaaagc | 120 |
| gcaccttctg ctaccccacc cagaacgcca gcggctgggc tgtgcagcca tgatcgccaa | 180 |
| cccctccctc ttcttgagca attcgggaaga gcgatttccg ccgactgaac acgtcgaaaa | 240 |
| tggcagtttt ccaccgaaaa aaggaaagga ccataggaaa ggattaatat cttattttta | 300 |
| tctaggggtt tgccgatccg cgattttcgc tgggaaaccg ccaaaaatgg cttgccatta | 360 |
| ggtcgcacca catgcgacca taaagtcgca cagtgtgcga cctattcggc ccatatacag | 420 |
| aggttcccca catgcggaat gtcacccgtc tcaagaccgg caaagaccgg ctccgcgagg | 480 |
| accaagccga cctgttgaag caagcccttc tgcccttcgc agaggacgat ggaccgatgc | 540 |
| gggatgcggc cggacggctc tacgtccaga tcaagaacct caccaccca gaccccgaa | 600 |
| ccacggagcc gttcgtcatg atccgtcccg ccagaaatcg cgccgtcacc ctctggctgc | 660 |
| tgaagaacag taagcggccc atgaaggcgg tggacgtatg gacgtgctg ttcgaccacc | 720 |
| tgtttcccca taccggccag atcatgctga cccttgagga aatcgcgga aaagtcggt | 780 |
| tccgggtcaa cgaagttaca gccgtcatga acgagctggt gagcttcggc gcgattttct | 840 |
| ccgagcgcga gaaggtggcc ggaatgcgog ggccgggcct cgcccgctac tacatgaacc | 900 |
| ggcatgtggc cgaggtcggc agccgcgcca cgcaggaaga acttgcccta atcccacgcc | 960 |
| ccggcgccaa gctggcagtc gtgcaggggt gcaaggctta acccatgaag gtttcggaac | 1020 |
| tggacgtgtt cgacagcgcc aaggcggcac aagaccggtt ggtgcgggaa gaactgctgc | 1080 |
| aagcagcgca ggcggacggc cacggcccg cctcgtctca tgcccgttcc gtcatagcca | 1140 |
| aggcgcgggc cggcagggac gccaaggctt aacggcccg ccctctcccg cctcgatccc | 1200 |
| ggcgggcctg tagcatctcc tgatgctcct tggcgTTTTT ggcccgctgc tggcccgct | 1260 |
| ctttctcggc cgctgcggt cttaggcgct cttcgccag ccgcatccgc tegtccatct | 1320 |
| gacgtttccg atctgcctcg gcatccttgg cggtcctgc cttcagccct ttgtgaaag | 1380 |
| ccatccactt attggcggtt ttctcggtt tctgctgtat cggcggggtc agccggtcaa | 1440 |
| atgcctgggc caccctctcg aagccctcac gcatggcgtt gacggcctgc gccagtttag | 1500 |
| ccagggcgaa atctatcacc tcggcccgct gggcgttctc ggcccgata cgccggttgt | 1560 |
| ggttgcgggt cggggtctgg tggcccttcc gttccagagc caccacattc ggccccatgt | 1620 |
| gccgctctgg aacgcggtct agccctgtct ccgattgct ccggtgatct atccgggcct | 1680 |
| cttgcccagc ccgtctagc gcggcattgg caaggccgc ccatagctgc cggatttct | 1740 |
| tcacctcgtc ggccggccttc ccagtcacca tgccctgcg cttcttctcg gacagttcga | 1800 |
| tggttgatit gtctccaaag gacagcttgc catcggcccc ccgtccacc gtgcgggtgg | 1860 |
| tggtcatgat gtgcgcgtga tgattcgggt cgtgcgcctc gtcaccgga agatgcacgg | 1920 |

図 10

```

ccacgtccac ggccaccccg taccgtgga ccaactcac gcgaaactg tccgccagtt 1980
cggcccgtg ctgctggtg agttcatgag ggaggggccac aaccattcc ctcccggtgc 2040
ggcgctcctt gcgtttctct gatcgctcg cgtcattcca caattccgaa cggtcagcgg 2100
tgccaccccc cggaatgaaa attgccttat gggcaacgtt attctgctg gggctgtatt 2160
tgtgttcgtg cccgtcaacc tcgttggta aatcctcgcc agcacgatac gcagccgcag 2220
ccacaacgga acgccctgag ctccggctga tcggtttcgt ttctgcgca tagattgcc 2280
cggatcgagc gcctacctt tggagttaaa cgggggggttc agggggggcga agccaccatg 2340
acgcaggact tgcacttgt caagtcgtaa ctgcgccctt aatacctgac ggcatcaagg 2400
gatattgtgtt attcgtttga aacggaacgg ctccacgggt aggatgatatt gagcgatatt 2460
gcgaagaga ttgagaacgc caaaaggatc atagctgaac agaaaaagcg catcaaagat 2520
gccagaagg aagcagctaa agcgaatca aagttgagg accgtcagaa ctacatcttg 2580
ggcggcgcac tggtaaaact tgccgaaaca gatgaacggg ccgtccgcac tattgaaaca 2640
cttttgaagc tgggtgatcg tccatcagac cggaaggcgt ttgagggttt ttcccgcttc 2700
ccatccctct cctgcccac gcagccagca ccggacaccg gccatgagtg aggcactgga 2760
agaagatccg ttgaaactgt tcaaaagggt cgaaaaaagc ctgtccacgg ccaccgccag 2820
catggagcgg ctggccgccg aacaagatgc cagggtgcaag accatttcag acgccgccgg 2880
aaaagcctct aaattggcgg aggaagccgg tgacacctc acagcatcca agaggcgtct 2940
gatgatctgg acggccctct ggcggctct gctggctgtt ggcgggtggt tggcgggtta 3000
ttggctggga caccgtgacg gttgggcctc tggcacggcc cagcagctct aagaaacat 3060
tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggcccttcc gtctcgcgcg 3120
tttcgggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg 3180
tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttgccgg 3240
gtgtcggggc tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcaccatat 3300
gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcacagggc gccattcgcc 3360
attcaggctg cgcaactgtt gggaaggcgg atcgggtcgg gcctcttcgc tattaogcca 3420
gctggcgaaa ggggatgtg ctgcaaggcg attaagttgg gtaacgccag ggttttccca 3480
gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtgc caagcttgc tgcctgcagg tcgactctag 3540
aggatccccg ggtaccgagc tcgaattcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa 3600
attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaacct 3660
ggsgtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgtcactg cccgctttcc 3720
agtccggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg 3780
gtttgcgtat tgggcgclct tccgcttcc cgtcactga ctgctgcgc tcggtcgttc 3840
ggctgcggcg agcggatatc gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag 3900
gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa 3960
aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggg tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc 4020
gacgtcaag tcagagggtg cgaacccgga caggactata aagataccag gcgtttcccc 4080

```

☒ 1 1

| | |
|---|------|
| ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttacogga tacctgtccg | 4140 |
| cctttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc acgctgtagg tatctcagtt | 4200 |
| cggtgtaggt cgttcgcrcc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc | 4260 |
| gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc | 4320 |
| cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag | 4380 |
| agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct aactagaag gacagtatctt ggtatctgcg | 4440 |
| ctctgctgaa gccagttacc ttcgaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa | 4500 |
| ccaccgctgg tagcgggtgtt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag | 4560 |
| gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cgggggtctga cgctcagtggt aacgaaaact | 4620 |
| cacgttaagg gattttgtgc atgagattat caaaaaggat ctccacctag atccttttaa | 4680 |
| attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt | 4740 |
| accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag | 4800 |
| ttgcctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga gggttacca tctggcccca | 4860 |
| gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc | 4920 |
| agccagccgg aaggccgag cgcagaagtg gtcttgcaac tttatccgcc tccatccagt | 4980 |
| ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa tagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg | 5040 |
| ttgttgccat tgctacaggc atcgttgtgt cagcgtcgtc gtttggtatg gcttcattca | 5100 |
| gctccgggtc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttggtc aaaaaagcgg | 5160 |
| ttagctcctt cggctctccg atcgttgta gaagtaagt ggccgcagtg ttatcactca | 5220 |
| tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcctttctg | 5280 |
| tgactgggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagt tatgcggcga ccgagttgct | 5340 |
| cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca | 5400 |
| tcattggaaa acgtttctcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca | 5460 |
| ttcgatgtaa cccactcgtg caccacaact atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt | 5520 |
| ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg | 5580 |
| gaaatgttga atactcatac tcttctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta | 5640 |
| ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaataa taggggttcc | 5700 |
| gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtc | 5734 |

図 1 2

cgctgacgtc gtgggccgtg ccagaggccc

図 1 3

ggccaagacg tctgcagcat ggggcgtcac

SEQUENCE LISTING

- <110> Mitsukan Group Corporation
- <120> Structural gene responsible for high temperature tolerance in acetic acid bacteria, acetic acid bacteria transformed with said gene, and acetic acid fermentation using said transformants
- <130> 6752
- <141> 2003-12-04
- <160> 7
- <210> 1
- <211> 1313
- <212> DNA
- <213> *Gluconacetobacter entanii*
- <400> 1

```

gaagagtgat attacacttc cctgacgccg ttttctaatt tgctccatac gcgggacctt   60
gccggaaaga taatgtctgt tttcaacgct cttgtttcac ccgccggact ggccgcgacc  120
gttgcggtcg ccgggtgcat gcaggcagcg cttggcactt ttctggtctc gcgtttccgg  180
tggcaggaaa aacgcatgga ccgggcggtg cccatgcctc cggtttccgt gctcaagccc  240
ctccacggcg atgaaccgct gctggaggaa gcgcttgaaa gcttctgcac gcaggattac  300
ccgcagatgc agatcgtctt tggcgtacag gccgaagacg atgcggcgat cccgatcgta  360
caacggttga tggaacgcca cccggatgtg cagatggaac tggtgattga cccacacttc  420
cacgggctca accgcaagat cggcaacctg atcaacatca tgacgcgcgt gaagcatgat  480
gtcctggtca tttccgattc ggatatccac gttgcccccg attacctgcg gcatgtggtg  540
ggcgccatgg tgcccgacaa tgtcggcctg gtcacgacgc tgtacgcggg gctgcccgcg  600
tcattcacgc tgccgcgcct gctggccgca tgccagatca accataactt cctgcccggc  660
gtgatgctgt cactctacct cgggcggcag gactgccttg gggcgacaat ggcgctgcgg  720
cgttccatgc tggacgaaat cggcgggctg gaagccctcg tgccgcatgt ggccgatgat  780
gcgatactgg gccgttacgt gcgtgaccgt ggcaaggata tcgccattgc cgcgtgcatg  840
acctggacca ccgtgggcga gacctcgatg cgtgaggtgc tggcgcatga actgcgctgg  900
ggccggaccg tcaagacgct ggagcctgcg ggttatgccg catccgccat ccagctgccc  960

```

ctgttctggg ccagcgtcgc cgtgcttgcc gcgccgcatg cgacctggac atggtccttc 1020
 tttcttggtg catggggatg gcgggccgtg tgttccttca tcctggaccg tacgctggcg 1080
 caacgtagtc tgggtgctgcc gtcactgctt ctgccactgc gcgactggat ctcggccgcc 1140
 gtcatggtgg gcagtgtcac tggcacgcgg gttgcatggc gtgggcagac aatgcatgtc 1200
 acgccccatt cggtcatgac accacgatcg caaccggctt cccccgtga ctgaccgcc 1260
 gtcagcaggc tgaactgctt gagaattcca accctgtcgt taataagaac ggg 1313

<210> 2

<211> 393

<212> PRT

<213> Gluconacetobacter entanii

<400> 2

Met Ser Val Phe Asn Ala Leu Val Ser Pro Ala Gly Leu Ala Ala Thr
 5 10 15
 Val Ala Val Ala Gly Cys Met Gln Ala Ala Leu Gly Thr Phe Leu Val
 20 25 30
 Ser Arg Phe Arg Trp Gln Glu Lys Arg Met Asp Arg Ala Val Pro Met
 35 40 45
 Pro Pro Val Ser Val Leu Lys Pro Leu His Gly Asp Glu Pro Leu Leu
 50 55 60
 Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Cys Thr Gln Asp Tyr Pro Gln Met Gln
 65 70 75 80
 Ile Val Phe Gly Val Gln Ala Glu Asp Asp Ala Ala Ile Pro Ile Val
 85 90 95
 Gln Arg Leu Met Glu Arg His Pro Asp Val Gln Met Glu Leu Val Ile
 100 105 110
 Asp Pro Thr Phe His Gly Leu Asn Arg Lys Ile Gly Asn Leu Ile Asn
 115 120 125
 Ile Met Thr Arg Val Lys His Asp Val Leu Val Ile Ser Asp Ser Asp

| | | |
|---|-----|-----|
| 130 | 135 | 140 |
| Ile His Val Ala Pro Asp Tyr Leu Arg His Val Val Gly Ala Met Val | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Pro Asp Asn Val Gly Leu Val Thr Thr Leu Tyr Ala Gly Leu Pro Ala | | 160 |
| | 165 | 170 |
| Ser Ser Thr Leu Pro Arg Leu Leu Ala Ala Cys Gln Ile Asn His Asn | | 175 |
| | 180 | 185 |
| Phe Leu Pro Gly Val Met Leu Ser Leu Tyr Leu Gly Arg Gln Asp Cys | | 190 |
| | 195 | 200 |
| Leu Gly Ala Thr Met Ala Leu Arg Arg Ser Met Leu Asp Glu Ile Gly | | 205 |
| | 210 | 215 |
| Gly Leu Glu Ala Leu Val Pro His Val Ala Asp Asp Ala Ile Leu Gly | | 220 |
| | 225 | 230 |
| Arg Tyr Val Arg Asp Arg Gly Lys Asp Ile Ala Ile Ala Ala Cys Met | | 235 |
| | 245 | 250 |
| Thr Trp Thr Thr Val Gly Glu Thr Ser Met Arg Glu Val Leu Ala His | | 255 |
| | 260 | 265 |
| Glu Leu Arg Trp Gly Arg Thr Val Lys Thr Leu Glu Pro Ala Gly Tyr | | 270 |
| | 275 | 280 |
| Ala Ala Ser Ala Ile Gln Leu Pro Leu Phe Trp Ala Ser Val Ala Val | | 285 |
| | 290 | 295 |
| Leu Ala Ala Pro His Ala Thr Trp Thr Trp Ser Phe Phe Leu Gly Ala | | 300 |
| | 305 | 310 |
| Trp Gly Trp Arg Ala Val Cys Ser Phe Ile Leu Asp Arg Thr Leu Ala | | 315 |
| | 325 | 330 |
| Gln Arg Ser Leu Val Leu Pro Ser Leu Leu Leu Pro Leu Arg Asp Trp | | 335 |
| | 340 | 345 |
| Ile Ser Ala Ala Val Met Val Gly Ser Val Thr Gly Thr Arg Val Ala | | 350 |
| | 355 | 360 |
| | | 365 |

Trp Arg Gly Gln Thr Met His Val Thr Pro His Ser Val Met Thr Pro

370

375

380

Arg Ser Gln Pro Ala Ser Pro Gly Asp

390

393

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gaagagtgat attacacttc cctgacgccg

30

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

cccgttctta ttaacgacag gggttg

26

<210> 5

<211> 5734

<212> DNA

<213> Gluconacetobacter entanii

<400> 5

catggggcgt cccccccagc ggccagcttg gctacctgat ggacagggcg ggccttctgc 60

aagccctcgg ccaactgccat ctgccgggat atgaggccaa atacgaaccg aaggaaaagc 120

gcaccttctg ctaccccacc cagaacgcc a gggctgggc tgtgcagcca tgatcgccaa 180

cccctccctc ttcctgagca attcggaaga gcgatttccg ccgactgaac acgtcgaaaa 240

tggcagtttt ccaccgaaaa aaggaaagga ccataggaaa ggattaatat cttattttta 300

| | |
|--|------|
| tctaggggtt tgccgatccg cgattttcgc tgggaaaccg ccaaaaatgg cttgccatta | 360 |
| ggtcgcacca catgcgacca taaagtgcga cagtgtgcga cctattcggc ccatatacag | 420 |
| aggttcccca catgcggaat gtcacccgtc tcaagacccg caaagaccgg ctccgcgagg | 480 |
| accaagccga cctgttgaag caagcccttc tgcccttcgc agaggacgat ggaccgatgc | 540 |
| gggatgcggt cggacggctc tacgtccaga tcaagaacct caccacccca gaccccgga | 600 |
| ccacggagcc gttcgtcatg atccgtcccg ccagaaatcg cgccgtcacc ctctggctgc | 660 |
| tgaagaacag taagcggccc atgaaggccg tggacgtatg gacgctgctg ttcgaccacc | 720 |
| tgtttcccca taccggccag atcatgctga ccgctgagga aatcgcgga aaagtgcgta | 780 |
| tccgggtcaa cgaagttaca gccgtcatga acgagctggt gagcttcggc gcgattttct | 840 |
| ccgagcgcga gaaggtggcc ggaatgcgcg ggccgggcct cgcccgctac tacatgaacc | 900 |
| ggcatgtggc cgaggtcggc agccgcgcca cgcaggaaga acttgcccta atcccacgcc | 960 |
| ccggcgccaa gctggcagtc gtgcagggtg gcaaggctta acccatgaag gtttcggaac | 1020 |
| tggacgtgtt cgacagcgcc aaggcggcac aagaccggtt ggtgcgggaa gaactgctgc | 1080 |
| aagcagcgca ggccggacggc cacggccccg ccctcgtca tgcccgttcc gtcatagcca | 1140 |
| aggcgcgggc cgggcaggac gccaaaggctt aacggccccg ccctctcccg cctcgatccc | 1200 |
| ggcgggcctg tagcatctcc tgatgtcct tggcgttttt ggcccgtgc tcggcccgt | 1260 |
| ctttctcggc cgctgcggct cttaggcgct cttcggccag ccgcatccgc tcgtccatct | 1320 |
| gacgtttccg atctgcctcg gcatccttgg cggtcctgc cttcagccct ttgctgaaag | 1380 |
| ccatccactt attggcggtt ttctcggtt tctgctgtat cggcggggtc agccgggtcaa | 1440 |
| atgcctgggc caccctctcg aagccctcac gcatggcggt gacggcctgc gccagtttag | 1500 |
| ccaggcgaa atctatcacc tcggcccgtt gggcgttctc ggcccggata cgccggttgt | 1560 |
| ggttgccggt cggggtctgg tggcccttc gttccagagc caccacattc ggccccatgt | 1620 |
| gccgctctgg aacgcggtct agcccctgct ccgattgct ccggtgatct atccgggcct | 1680 |
| cttgcccagc ccgctctagc gcggcattgg caaggccgc ccatagctgc cggatttcct | 1740 |
| tcacctgctc ggccgacctc ccagtcacca tgccctgccg cttcttgctg gacagttcga | 1800 |
| tggttgattt gtctccaaag gacagcttgc catcgccccc ccgctccacc gtgcgggtgg | 1860 |
| tggtcatgat gtgcgctga tgattccggt cgtgccctc gtcacccgga agatgcacgg | 1920 |
| ccacgtccac ggccaccccg taccgtgga ccaactcac gcgaaactg tccgccagtt | 1980 |
| cggcccgtg ctgctggtg agttcatgag ggagggccac aaccattcc ctcccgtgc | 2040 |

| | |
|---|------|
| gggcgtcctt gcgtttctct gatcgctccg cgtcattcca caattccgaa cggtcagcgg | 2100 |
| tgccaccccc cggaatgaaa attgccttat gggcaacgct attctgcctg gggctgtatt | 2160 |
| tgtgttcgtg cccgtcaacc tcgttggtca aatcctcgcc agcacgatac gcagccgcag | 2220 |
| ccacaacgga acgccctgcg ctccggctga tcggtttcgt ttctgcgcga tagattgcca | 2280 |
| cggatcgagc gcctaccttt tggagttaaa cgggggggttc aggggggcga agccaccatg | 2340 |
| acgcaggact tgcacttggt caagtcgtaa ctgcgccctt aatacctgac ggcattcaagg | 2400 |
| gatatgtggt attcgtttga aacggaacgg ctccacgggtg aggatgatatt gagcgatatt | 2460 |
| gcgaaagaga ttgagaacgc caaaaggatc atagctgaac agaaaaagcg catcaaagat | 2520 |
| gcccagaagg aagcagctaa agcggaatca aagttgaggg accgtcagaa ctacatcttg | 2580 |
| ggcggcgcac tggtaaaact tgccgaaaca gatgaacggg ccgtccgcac tattgaaaca | 2640 |
| cttttgaagc tgggtgatcg tccatcagac cggaaggcgt ttgaggtgtt ttcccgtctc | 2700 |
| ccatccctct ccctgccac gcagccagca ccggacaccg gccatgagtg aggcaactgga | 2760 |
| agaagatccg tttgaactgt tcaaaagggt cgaaaaaagc ctgtccacgg ccaccgccag | 2820 |
| catggagcgg ctggccgccg aacaagatgc caggtgcaag accatttcag acgccgccgg | 2880 |
| aaaagcctct aaattggccg aggaagccgg tgacaccttc acagcatcca agaggcgtct | 2940 |
| gatgatctgg acggccctct gcgcggctct gctggtctgt ggcgggtggt tggcgggtta | 3000 |
| ttggctggga caccgtgacg gttgggcctc tggcacggcc cagcagctct aagaaacat | 3060 |
| tattatcatg acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggcccttc gtctcgcgcg | 3120 |
| tttcggtgat gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg | 3180 |
| tctgtaagcg gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttggcgg | 3240 |
| gtgtcggggc tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcaccatat | 3300 |
| gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcattcaggc gccattcgcc | 3360 |
| attcaggctg cgcaactgtt gggaaggcg atcgggtgcgg gcctcttcgc tattacgcca | 3420 |
| gctggcgaaa gggggatgtg ctgcaaggcg attaagttgg gtaacgccag ggttttccca | 3480 |
| gtcacgacgt tgtaaaacga cggccagtgc caagcttgca tgcttcaggg tcgactctag | 3540 |
| aggatccccg ggtaccgagc tcgaattcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa | 3600 |
| attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct | 3660 |
| ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc | 3720 |
| agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg | 3780 |

| | |
|--|------|
| gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc | 3840 |
| ggctgcggcg agcgggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag | 3900 |
| gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa | 3960 |
| aggccgcggtt gctggcggtt ttccatagcg tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc | 4020 |
| gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc | 4080 |
| ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg | 4140 |
| cctttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc acgctgtagg tatctcagtt | 4200 |
| cgggtgtaggt cgttcgtcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccagcc | 4260 |
| gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc | 4320 |
| cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag | 4380 |
| agttcttgaa gtggtggcct aactacggct aactagaag gacagtatct ggtatctgcg | 4440 |
| ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa | 4500 |
| ccaccgctgg tagcgggtgg ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag | 4560 |
| gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact | 4620 |
| cacgttaagg gatcttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa | 4680 |
| attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt | 4740 |
| accaatgctt aatcagttag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag | 4800 |
| ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca | 4860 |
| gtgctgcaat gataccgca gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc | 4920 |
| agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtctgcaac tttatccgcc tccatccagt | 4980 |
| ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttgcc agttaatagt ttgcgcaacg | 5040 |
| ttgttgccat tgctacaggc atcgtgggtg cagctcgtc gtttggtatg gcttcattca | 5100 |
| gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaagcgg | 5160 |
| ttagctcctt cggctcctcg atcgttgta gaagtaagt ggccgcagtg ttatcactca | 5220 |
| tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg | 5280 |
| tgactggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagt tatgcggcga ccgagttgct | 5340 |
| cttgcccggc gtcaatacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca | 5400 |
| tcattggaaa acgtttctcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca | 5460 |
| ttcgatgtaa ccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt | 5520 |

ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg 5580
gaaatgttga atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 5640
ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaataa taggggttcc 5700
gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtc 5734

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 6

cgctgacgtc gtgggccgtg ccagaggccc 30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 7

ggccaagacg tctgcagcat ggggcgtcac 30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/15542

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K14/195, C12N1/21, C12J1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K14/195, C12N1/21, C12J1/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq,
Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A | JP 54-46899 A (Nakano Vinegar Co., Ltd.), 13 April, 1979 (13.04.79), (Family: none) | 1-7 |
| A | JP 60-9488 A (Teruhiko BEPPU), 18 January, 1985 (18.01.85), (Family: none) | 1-7 |
| A | JP 2002-95493 A (Yugen Kaisha Yamaguchi TLO), 02 April, 2002 (02.04.02), (Family: none) | 1-7 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
23 February, 2004 (23.02.04)

Date of mailing of the international search report
09 March, 2004 (09.03.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/09, C07K14/195, C12N1/21, C12J1/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/09, C07K14/195, C12N1/21, C12J1/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE, BIOSIS/WPI (DIALOG), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| A | JP 54-46899 A (株式会社中埜酢店) 1979. 04. 13 (ファミリーなし) | 1-7 |
| A | JP 60-9488 A (別府輝彦) 1985. 01. 18 (ファミリーなし) | 1-7 |
| A | JP 2002-95493 A (有限会社山口ティール・エル・オー) 2002. 04. 02 (ファミリーなし) | 1-7 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 02. 2004

国際調査報告の発送日

09. 3. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 耕一郎

4 N

3 2 2 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3488